

STEFAN STOJAŁOWSKI**PAWEŁ MILCZARSKI**Katedra Genetyki i Hodowli Roślin
Akademia Rolnicza w Szczecinie

Markery molekularne sprzężone z *locus* genu przywracającego płodność u mieszańców żyta z cytoplazmą CMS-C*

Molecular markers linked with *locus* of the gene restoring male fertility in hybrids of rye with cytoplasm CMS-C

Analizami objęto dwie populacje F₂ mieszańców międzyliniowych żyta oraz zestaw 62 rekombinacyjnych linii wsobnych (RIL-F₇) żyta wyprowadzonych z mieszańca 541 × Ot1-3. Potwierdzono istnienie sprzężenia między uprzednio wytypowanymi trzema markerami RAPD, a genem kontrolującym męską sterylność w cytoplazmie C. Dodatkowo zidentyfikowano zestaw pięciu nowych markerów RAPD sprzężonych z genem *Rfc1*, ale wśród nich tylko jeden wykazywał sprzężenie z genem męskiej sterylności wystarczająco silne dla podjęcia prób wykorzystania go przy selekcjonowaniu materiałów hodowlanych.

Słowa kluczowe: cytoplazmatyczna męska sterylność, mapowanie genetyczne, RAPD, żyto

Two F₂ populations of the interline crosses and a set of 62 recombinant inbred lines (RILs-F₇) of rye developed from the cross 541 × Ot1-3 were analyzed during this study. The existence of linkage between formerly found three RAPD markers and the restorer locus for cytoplasm C was affirmed. Additionally, a set of five new RAPD markers linked with *Rfc1* locus was identified, but only one of these markers was close enough to be attempted in using in marker assisted selection programme.

Key words: cytoplasmic male sterility, genetic mapping, RAPD, rye

WSTĘP

Rosnące znaczenie odmian mieszańcowych żyta idzie w parze z coraz lepszym poznaniem podstaw dziedziczenia zaburzeń w wytwarzaniu pyłku u form ze sterylizującą cytoplazmą (CMS). Istotny postęp w badaniach notuje się przede wszystkim w odniesieniu do cytoplazmy Pampa (CMS-P) odkrytej pod koniec lat 60. XX wieku w populacji żyta pochodzenia argentyńskiego (Geiger i Schnell, 1970). Geny jądrowe kontrolujące męską

* Praca dofinansowana przez AR w Szczecinie w ramach badań własnych: BW/HK/01/02 i BW/HK/02/03

sterylność w cytoplazmie Pampa zlokalizowano na chromosomach 1R, 3R, 4R, 5R i 6R (Miedaner i in., 2000), a dla genów zidentyfikowanych na długim ramieniu chromosomu 4R opracowano zestaw markerów SCAR (Stracke i in., 2003) znajdujących zastosowanie w pracach selekcyjnych.

Alternatywny wobec CMS-P typ cytoplazmy sterylizującej określany jako CMS-V jest reprezentowany przez szereg źródeł, takich jak: cytoplazma R (Kobyljanskij, 1971), C (Łapiński, 1972), G (Adolf i Winkel, 1985) i wiele innych. Na podstawie analiz mieszańców z udziałem trisomików żyta określono chromosomową lokalizację genów przywracających płodność w cytoplazmie G (Melz i Adolf, 1991), a jeden z nich, wykazujący najsilniejszy wpływ na tę cechę, został zmapowany na długim ramieniu chromosomu 4R (Börner i in., 1998). Ostatnio zidentyfikowano w tym samym regionie genomu zestaw markerów RAPD sprzężonych z genem przywracającym płodność pręcikowia u mieszańców żyta z cytoplazmą C (Stojałowski i in., 2004). Celem prezentowanych badań była ocena przydatności wykrytych markerów RAPD do identyfikowania genotypów niosących allele sterylności w materiałach hodowlanych posiadających cytoplazmę normalną oraz próba znalezienia nowych markerów sprzężonych z genem kontrolującym męską sterylność w cytoplazmie CMS-C.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły dwie populacje F_2 i jedna RIL- F_7 (rekombinacyjne linie wsobne) wyprowadzone z mieszańców między liniami wsobnymi żyta. W populacjach $(544 \times L1)F_2$ i $(544 \times DS2)F_2$, liczących odpowiednio 61 i 67 roślin, linią mateczną była linia dopełniająca męską sterylność w cytoplazmie CMS-C, a obie linie ojcowskie były liniami przywracającymi płodność. Materiałem wyjściowym do wyprowadzenia populacji 62 rekombinacyjnych linii wsobnych (RIL- F_7) był mieszaniec między linią dopełniającą 541 a linią Ot1-3 przywracającą płodność mieszańców z cytoplazmą C. Wszystkie linie rodzicielskie oraz wyprowadzone po ich skrzyżowaniu potomstwa były w pełni męskopłodne, co wynika z faktu, że obie linie mateczne użyte do krzyżowań posiadały cytoplazmę normalną.

DNA wyizolowano z liści pobranych w fazie krzewienia i zamrożonych w -70°C . Przy analizach obu populacji F_2 zastosowano uproszczoną metodę izolacji opracowaną przez Thomson i Henry'ego (1995). DNA linii rekombinacyjnych (RIL) otrzymano przy użyciu zestawu DNeasy Plant Mini Kit firmy Qiagen. Reakcje RAPD-PCR prowadzono w termocyklerach PTC-200 (MJ Research) zgodnie z metodyką opisaną przez Myśków i wsp. (2001). W badaniach użyto 15 starterów 10-nukleotydowych generujących markery zmapowane w czasie prac nad innymi mieszańcami żyta na długim ramieniu chromosomu 4R (Banek-Tabor, 2004; Stojałowski i in., 2004).

Zgodność segregacji markerów RAPD z jednogenowym modelem dziedziczenia oceniano przy użyciu standardowego testu χ^2 . Grupy sprzężeń markerów konstruowano przy użyciu programu Mapmaker 3.0 (Lander i in., 1987) przy $\text{LOD} = 3,0$, wykorzystując funkcję Kosambi.

W celu określenia segregacji alleli męskiej sterylności/płodności w badanych populacjach wykonano serię krzyżowań testowych z udziałem męskosterylnych linii z cytoplazmą C. Płodność uzyskanych mieszańców oceniano wzrokowo korzystając z 9-stopniowej skali bonitacyjnej opracowanej przez Geigera i Morgensterna (1975), w której roślinom męskosterylnym przypisywane są wartości 1–3, częściowo płodnym 4–6, a męskopłodnym 7–9. Ocenę płodności przeprowadzono na:

- 35 mieszańcach F_1 między męskosterylną linią 544(CMS-C), a potomstwami F_3 (reprezentującymi genotypy użytych do analiz RAPD pojedynków F_2) otrzymanymi z populacji $544 \times L1$.
- 65 mieszańcach F_1 między męskosterylną linią 544(CMS-C), a pojedynkami pokolenia F_2 populacji $544 \times DS2$.
- 50 mieszańcach F_1 otrzymanych ze skrzyżowania męskosterylnej linii 541(CMS-C) z rekombinacyjnymi liniami wsobnymi tworzącymi populację RIL- F_7 .

W oparciu o wyniki oceny męskiej sterylności wnioskowano o genotypach poszczególnych pojedynków F_2 i rekombinacyjnych linii wsobnych i przypisując im trzy podstawowe kody genotypowe dla potrzeb mapowania genetycznego:

- A — dla genotypów dopełniających (posiadających allele męskiej sterylności pochodzące od linii matecznych, gdy badane potomstwa z krzyżowań testowych były męskojałowe),
- B — dla genotypów przywracających płodność (posiadających allele płodności pochodzące od linii ojcowskich, gdy oceniane potomstwa były w pełni męskopłodne)
- H — dla form heterozygotycznych (gdy w potomstwach mieszańców testowych obserwowano rozszczepienia na formy męskopłodne i męskosterylne).

W populacjach RIL możliwa jest obecność tylko form A i B, w populacjach F_2 — wszystkich trzech w/w form. Liczebności potomstw ocenianych pod względem płodności w większości przypadków mieściły się w granicach od 12 do 23. W kilku przypadkach, gdy liczebność mieszańców testowych z udziałem pojedynków populacji F_2 była bardzo niska (kilka roślin) i tym samym nie pozwalała na jednoznaczne określenie genotypu badanej rośliny w segregacjach wykorzystanych do konstrukcji map sprzężeń kodowano je jako:

- C — heterozygoty lub homozygoty pod względem alleli płodności oraz
- D — heterozygoty lub homozygoty pod względem alleli sterylności.

Uzyskane dane o segregacjach alleli męskiej sterylności/płodności we wszystkich trzech badanych populacjach pozostawały w zgodzie z jednogenowym modelem dziedziczenia, co pozwoliło na uwzględnienie ich przy konstruowaniu grup sprzężeń.

Potencjalną efektywność markerów przy selekcjonowaniu linii dopełniających oceniono dokonując wyboru wśród rekombinacyjnych linii wsobnych form reprezentujących mateczny allel RAPD i oceniając wśród nich proporcję genotypów męskosterylnych i męskopłodnych. Uzyskane wyniki porównano przy użyciu testu χ^2 z proporcjami dla całej badanej populacji RIL- F_7 .

WYNIKI I DYSKUSJA

Warunkiem do podjęcia próby zmapowania locus genu kontrolującego męską sterility w cytoplazmie C w oparciu o uzyskane dane fenotypowych objawów płodności, było monogeniczne uwarunkowanie tej cechy w badanych populacjach żyta. Płodność pręcikowia w cytoplazmie C i innych cytoplazmach z grupy CMS-V znajduje się pod kontrolą minimum trzech genów (Łapiński, 1990; Melz i Adolf, 1991; Stojałowski i Łapiński, 1997), z których jeden zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 4R wykazuje najsilniejsze działanie (Börner i in., 1998; Stojałowski i in., 2004). Linie ojcowskie L1, DS2 i Ot1-3 krzyżowane z liniami męskosterylnymi dawały już we wcześniej analizowanych mieszańcach rozszczepienia zgodne z modelem dziedziczenia jednogenowego (Łapiński, 1990). Zaobserwowane rozszczepienia prezentowane w niniejszej pracy były charakterystyczne dla cech dziedziczonych jednogenowo, a jednocześnie silne pylenie roślin, u których doszło do przywrócenia płodności, pozwoliło na postawienie hipotezy, że uzyskane segregacje są wynikiem działania silnej ekspresji genu zlokalizowanego na chromosomie 4RL.

Spośród 10 znanych markerów RAPD sprzężonych z genem kontrolującym płodność pręcikowia w cytoplazmie C (Stojałowski i in., 2004) trzy markery ujawniały polimorfizm między linią 544, a dwiema liniami ojcowskimi użytymi do wyprowadzenia populacji F₂: L1 i DS2. Po przeprowadzeniu analiz segregacji stwierdzono, że dwa z tych markerów wykazują dziedziczenie zgodne z modelem jednogenowym. Trzeci z badanych markerów — pr794/800bp segregował prawidłowo w populacji (544 × DS2)F₂, ale w mieszańcu (544 × L1)F₂ dawał rozszczepienia niezgodne z oczekiwaniami (tab. 1), których w związku z tym nie uwzględniono przy konstruowaniu grup sprzężeń.

Tabela 1

Segregacje analizowanych markerów w mapowanych populacjach żyta
Segregations of analyzed markers in mapping populations of rye

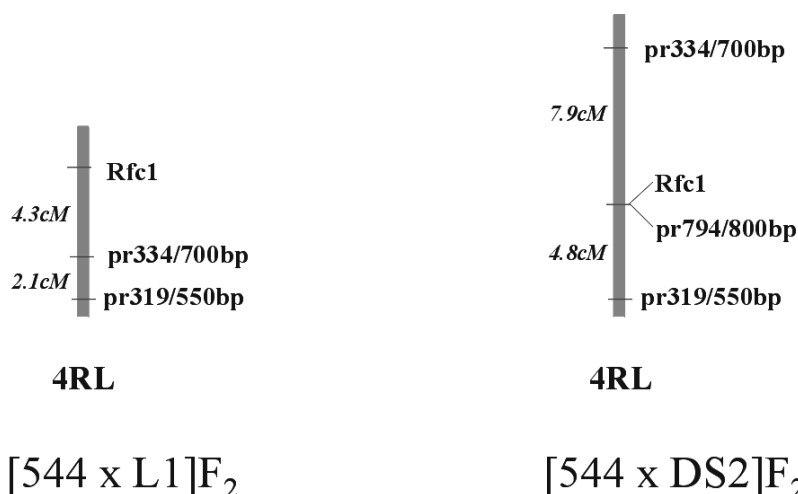
Mieszańiec Cross	Marker Marker	Pochodzenie prążka Origin of the band	Liczebność osobników reprezentujących allel RAPD Number of individuals representing RAPD allele		Oczekiwany stosunek rozszczepień Expected ratio	χ^2
			typu matczynego of maternal type	typu ojcowskiego of paternal type		
544 × L1 (F ₂)	pr319/550bp	544	51	10	3:1	2,41
	pr334/700bp	544	49	8	3:1	3,65
	pr794/800bp	L1	28	33	1:3	14,21**
544 × DS2 (F ₂)	pr319/550bp	544	50	16	3:1	0,02
	pr334/700bp	544	51	16	3:1	0,04
	pr794/800bp	DS2	12	48	1:3	0,80
541 × Ot1-3 (RIL)	pr479/1800bp	541	35	25	1:1	1,67
	pr502/680bp	Ot1-3	35	27	1:1	1,03
	pr510/750bp	541	33	29	1:1	0,26
	pr1139/840bp	541	34	28	1:1	0,58
	pr1251/840bp	541	28	34	1:1	0,58

** Odchylenie istotne przy P = 0,01

** Significant deviation at P = 0.01

Przypuszczalnie prążki amplifikowane po zastosowaniu startera pr794, pomimo że u obu badanych mieszańców migrują w żelu agarozowym z podobną dynamiką nie są tożsame. Marker obecny u mieszańca (544 × L1)F₂ należy prawdopodobnie do często spotykanych w przypadku techniki RAPD fragmentów stwarzających problemy przy uzyskiwaniu powtarzalnych rezultatów analiz, co przełożyło się na nadmiar w badanej populacji form nie posiadających prążka.

Grupy sprzężeń utworzone dla stabilnych, prawidłowo segregujących markerów z uwzględnieniem segregacji dla locus sterylności/płodności roślin z cytoplazmą C potwierdzają sugerowane wcześniej (Stojałowski i in., 2004) bliskie sąsiedztwo genu *Rfc1* i badanych loci RAPD (rys. 1). Różnice w kolejności ułożenia genów w obrębie utworzonych grup sprzężeń wynikają prawdopodobnie z małej liczby loci użytych do ich konstruowania oraz z niedostatecznej, dla precyzyjnego mapowania, liczby analizowanych segregantów w obu populacjach F₂. Uzyskane dane pozwalają jednak na stwierdzenie, że badane markery RAPD, po przekształceniu w specyficzne markery typu SCAR, mogą być przydatne jako narzędzie wspomagające prace selekcyjne w hodowli mieszańców żyta z cytoplazmą CMS-C.

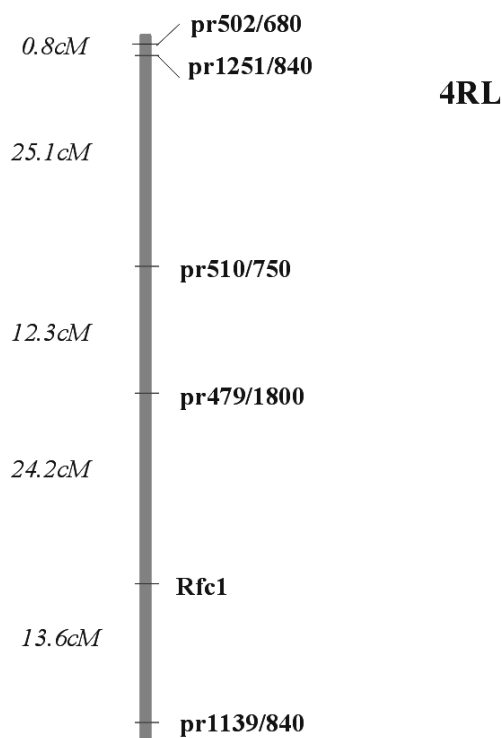


Rys. 1. Grupy sprzężeń markerów RAPD oraz przypuszczalna lokalizacja genu *Rfc1* w populacjach F₂ otrzymanych po skrzyżowaniu linii dopełniającej 544 z dwiema liniami przywracającymi płodność w cytoplazmie CMS-C

Fig. 1. Linkage groups of RAPD markers and supposed localization of *Rfc1* gene in F₂ populations derived from crosses between nonrestorer line 544 and two restorers for CMS-C cytoplasm

W dotychczas prezentowanych pracach, których celem było zmapowanie genów męskiej sterylności u żyta (Börner i in., 1998; Miedaner i in., 2000; Stojałowski i in., 2004) analizy segregacji markerów molekularnych oraz fenotypowych objawów płodności prowadzono na populacjach mapujących posiadających cytoplazmę sterylizującą. W praktycznej hodowli wyprowadzanie nowych linii dopełniających musi z oczywistych względów być realizowane w oparciu o rośliny z cytoplazmą normalną. Ocena, czy nowo

tworzona linia posiada wymagane allele sterility wymaga od hodowcy przeprowadzenia stosownych krzyżowań testowych. Zastosowanie markerów molekularnych jako narzędzia wspierającego wybór genotypów męskosterylnych przyczyniłoby się więc w sposób znaczący do ograniczenia nakładów pracy niezbędnych przy wyprowadzaniu linii dopełniających. Zaprezentowane w niniejszej pracy wyniki potwierdzają, że wykryte wcześniej markery mogą być do tego celu użyte, ale problemy ze stabilnością niektórych fragmentów RAPD przy pracach nad odmiennymi genetycznie materiałami wymuszają uprzednie przekształcenie tych markerów w markery typu SCAR.



Rys. 2. Mapa sprzężeń markerów RAPD dla populacji (541 × Ot1-3) RIL-F₇

Fig. 2. Linkage map of RAPD markers in population (541 × Ot1-3) RIL-F₇

Przydatność rekombinacyjnych linii wsobnych do identyfikowania markerów sprzężonych z loci męskiej sterility udowodniono na przykładzie pszenicy (Ahmed i in., 2001), ale nie prowadzono dotąd tego rodzaju prac na życie. Skonstruowanie na bazie pokolenia F₂ mieszańca 541 × Ot1-3 nowej mapy genetycznej żyta złożonej głównie z markerów RAPD (Banek-Tabor, 2004) oraz wyprowadzenie z tej samej kombinacji krzyżowania zestawu rekombinacyjnych linii wsobnych (Milczarski, niepublikowane) pozwoliło na podjęcie próby zidentyfikowania na bazie tych materiałów nowych markerów RAPD sprzężonych z locus *Rfc1*. Wykorzystano do tego celu zestaw markerów zlokalizowanych przez Banek-Tabor (2004) na długim ramieniu chromosomu 4R. Po

zmapowaniu tych markerów na populacji RIL-F₇ stwierdzono, że locus genu kontrolującego męską płodność w cytoplazmie C znajduje się pomiędzy markerami pr479/1800bp i pr1139/840bp (rys. 2).

Względnie duże odległości pomiędzy genem *Rfc1* a najbliższymi położonymi markerami ograniczają ich potencjalną skuteczność przy pracach selekcyjnych. Praktycznie tylko najbliższy położony marker pr1139/840bp pozwala na statystycznie istotne zwiększenie frekwencji genotypów męskosterylnych w wyselekcjonowanej grupie segregantów (tab. 2).

Tabela 2

Efektywność markerów RAPD przy selekcjonowaniu linii dopełniających męską sterylność w cytoplazmie CMS-C

Efficiency of RAPD markers in selection of lines acting as nonrestorers in CMS-C cytoplasm

Marker Marker	Liczebność linii reprezentujących mateczny allel RAPD Number of lines representing maternal RAPD allele			χ^2
	Linii dopełniających Nonrestorer lines	Linii przywracających płodność Restorer lines	ogółem total	
pr479/1800bp	18	9	27	3,00
pr502/680bp	16	14	30	0,13
pr510/750bp	15	10	25	1,00
pr1139/840bp	22	7	29	7,76**
pr1251/840bp	13	12	25	0,04
Ogółem Total	25	25		

** Odchylenie istotne przy P = 0,01

** Significant deviation at P = 0.01

WNIOSKI

1. Uzyskano potwierdzenie przydatności zidentyfikowanych wcześniej markerów RAPD do selekcji genotypów męskosterylnych żyta z cytoplazmą C, ale zaobserwowane problemy ze stabilnością niektórych markerów przy ocenie różnych genetycznie materiałów wskazują na konieczność przekształcenia ich w markery SCAR.
2. Zidentyfikowano pięć nowych markerów RAPD sprzężonych z locus kontrolującym męską sterylność w cytoplazmie C, ale tylko jeden z nich wykazuje efektywność wystarczającą do podjęcia prób użycia go w programach hodowlanych.

LITERATURA

- Adolf K., Winkel A. 1985. A new source of spontaneous sterility in winter rye — preliminary results. Proc. Eucarpia Meet. Cereal Sect. on Rye, Svalöv, Sweden, 1: 293 — 306.
- Ahmed T. A., Tsujimoto H., Sasakuma T. 2001. QTL analysis of fertility-restoration against cytoplasmic male sterility in wheat. Genes Genet. Syst. 76: 33 — 38.
- Banek-Tabor A. 2004. Konstrukcja mapy genetycznej żyta przy wykorzystaniu mieszańca międzyliniowego 541 × Ot1-3 i markerów RAPD. Praca doktorska AR Szczecin.
- Börner A., V. Korzun, A. Polley, S. Malyshev, Melz G. 1998. Genetics and molecular mapping of male fertility restoration locus (Rfg1) in rye (*Secale cereale* L.). Theor. Appl. Genet. 97: 99 — 102.

- Geiger H. H., Morgenstern K. 1975. Angewandt-genetische Studien zur cytoplasmatischen Pollensterilität bei Winterroggen. *Theor. Appl. Genet.* 46: 269 — 276.
- Geiger H. H., Schnell F. W. 1970. Cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.). *Crop Sci.* 10: 590 — 593.
- Kobylyanskij V. D. 1971. Sozdanie steril'nych abalogov sortov ozimoy rzi, zakrepitelej steril'nosti, vosstanovitelej fertil'nosti. *Tr. Prikl. Bot. Genet. Sel.* 44: 76 — 85.
- Lander E. S., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M. J., Lincoln S. E., Newburg L. 1987. Mapmaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174 — 181.
- Łapiński M. 1972. Cytoplasmic-genic type of male sterility in *Secale montanum* Guss. *Wheat Inform. Serv.* 35: 25 — 28.
- Łapiński M. 1990. Dziedziczenie jałowości pyłku u międzyliniowych mieszańców żyta z cytoplazmą źródła cms-C. *Hod. Rośl. Aklim.* 34: 47 — 53.
- Melz G., Adolf K. 1991. Genetic analysis of rye (*Secale cereale* L.). Genetics of male sterility of the G-type. *Theor. Appl. Genet.* 82: 761 — 764.
- Miedaner T., C. Glass, F. Dreyer, P. Wilde, H. Wortmann, Geiger H. H. 2000. Mapping of genes for male-fertility restoration in Pampa CMS winter rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 101: 1226 — 1233.
- Myśków B., Masojć P., Banek-Tabor A., Szołkowski A. 2001. Genetic diversity of inbred rye lines evaluated by RAPD analysis. *J. Appl. Genet.* 42: 1 — 4.
- Stojalowski S., Łapiński M. 1997. Jądrowa determinacja cechy jałowości pyłku u międzyliniowych mieszańców żyta z cytoplazmą cms-C. "Hodowla Roślin" — materiały z I Krajowej Konferencji. Poznań, 19–20 listopada 1997: 315 — 319.
- Stojalowski S., Łapiński M., Masojć P. 2004. RAPD markers linked with restorer genes for C-source of cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.). *Plant Breed.* 123: 428 — 433.
- Stracke S., Schilling A. G., Förster J., Weiss C., Glass C., Miedaner T., Geiger H. H. 2003. Development of PCR-based markers linked to dominant genes for male-fertility restoration in Pampa CMS of rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106: 1184 — 1190.
- Thomson D., Henry R., 1995. Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. *BioTechniques* 19: 394 — 400.